

10 / 538443

PCT/CN02/00940

10 JUN 2005

证 明

REC'D 19 FEB 2003

WFO PCT

本证明之附件是向本局提交的下列专利申请副本

申 请 日： 2002 12 10

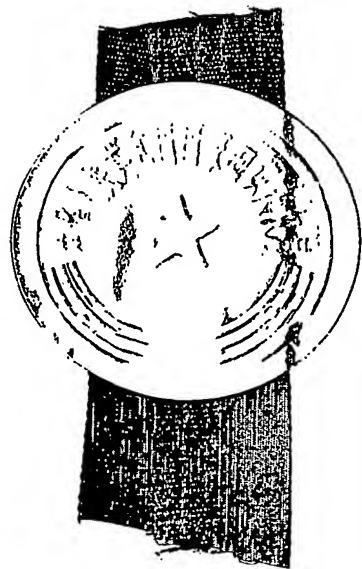
申 请 号： 02 1 55237.1

申 请 类 别： 发明

发明创造名称： 扩增靶细胞或病毒的核酸的方法及其试剂盒

申 请 人： 清华大学；北京博奥生物芯片有限责任公司

发明人或设计人： 谢欣；张旭；陈德朴；费维扬；程京



**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

中华人民共和国
国家知识产权局局长

王景川

2003 年 1 月 21 日

权 利 要 求 书

1. 一种扩增靶细胞或病毒的核酸的方法，该方法包括：
 - a) 将含有或可能含有靶细胞或病毒的样品与磁性微珠接触；
 - b) 如果在所述样品中存在所述靶细胞或病毒，允许其与所述磁性微珠结合，以
 - 5 在所述靶细胞或病毒与所述磁性微珠形成复合物；
 - c) 通过磁力从其它不需要的成分中分离所述复合物，以便所述靶细胞或病毒从所述样品中离析出来；和
 - d) 将所述被分离的复合物用于核酸扩增系统，以便对来自所述靶细胞或病毒的核酸进行扩增。
- 10 2. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述样品是临床样品。
3. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述样品选自血清、血浆、全血、痰、脑脊液、羊水、尿、胃肠内容物、头发、唾液、汗、齿龈刮取物、骨髓、组织和细胞培养物。
- 15 4. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述靶细胞选自动物细胞、植物细胞、真菌细胞、细菌细胞、重组细胞和培养细胞。
5. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述靶病毒是真核细胞病毒或噬菌体。
6. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述靶细胞是从全血、骨髓或淋巴分离的白细胞。
- 20 7. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述靶细胞是从唾液、尿和组织培养物中分离的上皮脱落细胞或细菌细胞。
8. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述磁性微珠为选自顺磁物质、铁磁物质和亚铁磁物质的可磁化物质。
9. 如权利要求 8 所述的方法，其特征在于，所述可磁化物质为金属组合物。
- 25 10. 如权利要求 9 所述的方法，其特征在于，所述金属组合物是过渡金属组合物或其合金。
11. 如权利要求 10 所述的方法，其特征在于，所述过渡金属选自铁、镍、铜、

钴、锰、钽、锆和钴钽锆 (CoTaZr) 合金。

12. 如权利要求 9 所述的方法, 其特征在于, 所述金属组合物是 Fe_3O_4 。

13. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述磁性微珠的直径范围是 5 到 50,000 纳米。

5 14. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述磁性微珠未经有机分子处理或是用有机分子改性。

15. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述磁性微珠是被改性的, 包括羟基、羧基、醛基、氨基或环氧基基团。

10 16. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述磁性微珠被改性, 包括能特定地与靶细胞或病毒结合的部分。

17. 如权利要求 16 所述的方法, 其特征在于, 所述结合部分是抗体或其功能片断。

18. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 如果在所述样品中存在靶细胞或病毒, 允许其高特异性、低特异性或非特异性地与磁性微珠结合, 以形成复合物。

15 19. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述方法进一步包括在将被分离的复合物用于核酸扩增系统之前洗涤被分离的复合物以去除不合要求的成分。

20. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述方法是自动化的。

21. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述方法是在 0.5 分钟—30 分钟的范围内完成的。

20 22. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述方法是在微量离心管中完成的。

23. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述方法是在不使用沉淀或离心过程的情况下, 不存在有毒试剂的情况下完成的。

24. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述方法是在 0°C — 35°C 的周围温度下完成的。

25 25. 如权利要求 24 所述的方法, 其特征在于, 所述方法是在室温下完成的。

26. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述样品体积范围是 $5\mu\text{l}$ — $50\mu\text{l}$ 。

27. 如权利要求 1 所述的方法, 其中所述核酸扩增系统选自聚合酶连式反应 (PCR)、连接酶连式反应 (LCR)、核酸序列基扩增 (NASBA)、链置换扩增 (SDA) 和转录调节扩增 (TMA) 系统。

28. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 该方法进一步包括在将样品与磁性微珠接触之前, 从含有或可能含有靶病毒或噬菌体的样品中去除细胞。

29. 一种扩增靶细胞或病毒的核酸的试剂盒, 该试剂盒在相同或不同容器中包括:

a) 一种用于接触含有或可能含有靶细胞或病毒的样品的磁性微珠;

b) 如果在所述样品中存在所述靶细胞或病毒, 允许其与所述磁性微珠结合,

以便在所述靶细胞或病毒与所述磁性微珠形成复合物的装置;

c) 通过磁力从所述样品中使所述复合物从其它不合要求的成分中分离出来的装置;

d) 一个用来扩增来自所述靶细胞或病毒的核酸的核酸扩增的系统。

30. 一种扩增靶细胞或病毒的核酸的方法, 该方法包括:

a) 将含有或可能含有靶细胞或病毒的样品与磁性微珠接触;

b) 如果在所述样品中存在所述靶细胞或病毒, 允许其与所述磁性微珠结合, 以便在所述靶细胞或病毒与所述磁性微珠形成复合物;

c) 通过磁力从其它不合要求的成分中分离所述复合物, 以便所述靶细胞或病毒从所述样品中离析出来;

d) 从所述细胞-微珠或病毒-微珠复合物释放核酸, 以形成核酸-微珠复合物; 和

e) 将所述被分离的核酸-微珠复合物用于核酸扩增系统, 以便对来自所述靶细胞或病毒的核酸进行扩增。

31. 如权利要求 31 所述的方法, 其特征在于, 该方法进一步包括在将核酸-微珠复合物用于核酸扩增系统之前, 洗涤核酸-微珠复合物以去除不合要求的成分。

32. 如权利要求 31 所述的方法, 其特征在于, 该方法进一步包括在将核酸-微珠复合物用于核酸扩增系统之前, 从其它不合要求的成分中分离核酸-微珠复合物。

33. 一种扩增靶细胞或病毒的核酸的试剂盒, 该试剂盒在相同或不同容器中包括:

a) 一种用于接触含有或可能含有靶细胞或病毒的样品的磁性微珠;

b) 如果在所述样品中存在所述靶细胞或病毒, 允许其与所述磁性微珠结合, 以

便在所述靶细胞或病毒与磁性微珠形成复合物的装置；

c) 通过磁力从所述样品中使所述复合物从其它不合要求的成分中分离出来的装置；

d) 所述细胞-微珠或病毒-微珠复合物释放核酸，以形成核酸-微珠复合物的装置；

5 和

e) 一个对来自所述靶细胞或病毒的核酸进行扩增的系统。

扩增靶细胞或病毒的核酸的方法及其试剂盒

5 技术领域

本发明涉及生物领域中扩增核酸的方法及其试剂盒，特别是涉及扩增靶细胞或病毒的核酸的方法和试剂盒。

技术背景

10 作为诊断分析和分子生物学研究的基础技术，多种核酸扩增方法的发明，如 PCR，促进了生命科学的发展。然而，由于复杂且耗时，PCR 模板的制备通常是限制技术发展速度的关键一步。如何实现快速且简单的 PCR 模板制备是一个亟待解决的问题。用于模板制备的一个很有前景的方法是生产自动的微型生物芯片。PCR 芯片的建立正在这种背景下逐渐发展起来。对分析过程自动化而言，整合模板制备和 PCR 方法是合适的。因此，可以建立用于生物化学分析的芯片实验室系统。

15 发明内容

本发明的目的，在于提供一种对生物芯片和微流路系统的构件有用的扩增靶细胞或病毒的核酸的方法。

本发明的另一目的，在于提供依据所述扩增靶细胞或病毒的核酸的方法而建立的试剂盒。

20 为了上述目的，一方面，本发明提供一种扩增靶细胞或病毒的核酸的方法，该方法包括：a) 将含有或可能含有靶细胞或病毒的样品与磁性微珠接触；b) 如果在所述样品中存在所述靶细胞或病毒，允许其与所述磁性微珠结合，以在所述靶细胞或病毒与所述磁性微珠形成复合物；和 c) 通过磁力从其它不合要求的成分中分离所述复合物，以便所述靶细胞或病毒从所述样品中离析出来；和 d) 将所述被分离的复合物用于核酸扩增系统，以便对来自所述靶细胞或病毒的核酸进行扩增。

25 另一方面，本发明提供一个扩增靶细胞或病毒的核酸的试剂盒，该试剂盒在相同或不同容器中包括：a) 一种用于接触含有或可能含有靶细胞或病毒的样品的磁性微珠；b) 如果在所述样品中存在所述靶细胞或病毒，允许其与所述磁性微珠结合，以便在所述靶细胞或病毒与所述磁性微珠形成复合物的装置；c) 通过磁力从所述样品中使所述复合物从其它不合要求的成分中分离出来的装置；和 d) 一个对来自所述靶细胞或病毒的核酸进行扩增的系统。

30 在另一方面，本发明提供一种扩增靶细胞或病毒的核酸的方法，该方法包括：a) 将含有或可能含有靶细胞或病毒的样品与磁性微珠接触；b) 如果在所述样品中存在

所述靶细胞或病毒，允许其与所述磁性微珠结合，以在所述靶细胞或病毒与所述磁性微珠形成复合物；c) 通过磁力从其它不合要求的成分中分离所述复合物，以便所述靶细胞或病毒从所述样品中离析出来；d) 从所述细胞-微珠或病毒-微珠复合物释放核酸，以形成核酸-微珠复合物；和 e) 将所述被分离的复合物用于核酸扩增系统，以便对来自所述靶细胞或病毒的核酸进行扩增。

仍然在另一方面，本发明提供一个扩增靶细胞或病毒的核酸的试剂盒，该试剂盒在相同或不同容器中包括：a) 一种用于接触含有或可能含有靶细胞或病毒的样品的磁性微珠；b) 如果在所述样品中存在所述靶细胞或病毒，允许其与所述磁性微珠结合，以便在所述靶细胞或病毒与所述磁性微珠形成复合物的装置；c) 通过磁力从所述样品中使所述复合物从其它不合要求的成分中分离出来的装置；d) 从所述细胞-微珠或病毒-微珠复合物释放核酸，以形成核酸-微珠复合物的装置；和 e) 一个对来自所述靶细胞或病毒的核酸进行扩增的系统。

依据上述技术方案，本发明采用了磁性微珠作为分离细胞和核酸的吸附载体，该磁性微珠可以容易地在电磁芯片上操作。被吸附的细胞和核酸不需要洗脱就可以被用作多种核酸扩增的模板，如 PCR 扩增的模板，同时，作为吸附载体，磁性微珠不会影响核酸扩增的特异性和效率。本发明在磁性微珠上整合了细胞分离、核酸制备和核酸扩增，在生物芯片和微流路系统的构建中很有用。

附图说明

图 1 说明 HLA-A 等位基因 (1, 100 bp) 的 PCR 产物。阳性对照组是使用传统方法分离 DNA 的 PCR 产物。凝胶上样量为 3 μ l 样品。泳道：(M)：DNA mass ladder (DL-2000, TaKaRa, Japan)；(1)：阴性对照；(2)：阳性对照；(3, 4)：按照本发明方法使用从全血样品制备的模板的“微珠-PCR”产物；(5, 6)：按照本发明方法使用从唾液样品制备的模板的“微珠-PCR”产物；(7, 8)：加入 2 μ l 全血作为模板；和(9, 10) 加入 2 μ l 唾液作为模板。

具体实施方式

为了使公开更清楚，但不受其限制，发明详述被分成下边的几部分进行叙述。

A. 定义

除非另外说明，此处所使用的技术和科学术语与本发明所属领域中任何普通技术人员一般理解的意思相同。此处所涉及的所有专利、申请、已公开的申请和其它出版物完整的引用于此作为参考。如果本部分所列出的定义与引用于此作为参考的这些专利、申请、已公开的申请和其它出版物中列出的定义相反或不一致，那么本部分列出的定义优先于此处所引入的作为参考资料中的定义。

在此所用，“一个”指“至少一个”或“一个或多个”。

在此所用,“特异性结合”指一种物质以依赖于特定分子结构的存在的另一种物质的结合。例如,受体将选择性地与含有和配体结合位点互补的化学结构的配体结合。

在此所用,“特异性结合对”指任何物质或一类物质,它对配体有排除其它物质的特异性结合的亲和力。在一个实施方案中,特异性结合对包括与样品配体互相作用的特异性结合分析试剂,或样品以免疫化学方式对配体的结合能力。例如,在试剂和/或样品配体或样品对配体的结合能力之间将存在抗原-抗体或半抗原-抗体关系。另外,本领域将会很好的理解到,配体和结合体之间的结合相互作用是特异性结合分析的基础,包括激素、维生素、代谢物、药物试剂、和它们各自的受体和结合物质之间的结合相互作用(如参考 Langan 等(编著), *Ligand Assay*, pp. 211 et seq., Masson Publishing U.S.A. Inc., New York, 1981)。

在此所用,“如果在所述样品中存在靶细胞或病毒,允许其与磁性微珠非特异性地或低特异性地结合,以形成复合物”指在磁性微珠和靶细胞或病毒之间没有特异性结合。例如,磁性微珠和靶细胞、细胞器或病毒之间的结合不受互补生物分子之间的特异性相互作用的介导,如配体和受体、抗原和抗体、模板和酶、碳水化合物和外源凝集素以及互补核酸等等之间的相互作用。也指磁性微珠不包括可以与靶细胞或病毒形成特异性结合对的部分。例如,不被包括在磁性微珠中的部分是生物分子如氨基酸、肽、蛋白质、核苷、核苷酸、寡核苷酸、核酸、维生素、单糖、寡糖、碳水化合物、脂类及其复合物。优选地,不被包括在磁性微珠中的部分是与靶细胞或病毒特异性结合的抗体。

在此所用,“对磁性微珠进行改性,以使包括与靶细胞或病毒特异性结合的部分”是指,对磁性微珠进行改性,以使包括可以与靶细胞或病毒形成特异性结合对的部分。

在此所用,“如果在所述样品中存在靶细胞或病毒,允许其与磁性微珠高特异性地结合”指磁性微珠特异性地与靶细胞或病毒结合。

在此所用,“抗体”指免疫球蛋白的特定类型,即 IgA、IgD、IgE、IgG 如 IgG₁、IgG₂、IgG₃ 和 IgG₄, 以及 IgM。抗体可以以任何合适的形式存在,而且可以含有任何合适的片断或衍生物。代表性的抗体包括多克隆抗体、单克隆抗体、Fab 片断、Fab' 片断、F(ab')₂ 片断、Fv 片断、微型双功能抗体、单链抗体和由抗体片断形成的多特异性抗体。

在此所用,“植物”指植物界的各种光合作用的、真核的多细胞生物体中的任一种,其特征是可以产生胚胎、含有叶绿体、有纤维素细胞壁且缺乏运动能力。

在此所用,“动物”指动物界的多细胞生物体,其特征是具有运动能力、非光合作用新陈代谢、对刺激有明确反应、生长受限且具有固定的身体结构。这些动物的

非限定性实例包括鸟类如小鸡, 脊椎动物如鱼, 哺乳动物如小鼠、大鼠、野兔、猫、狗、猪、奶牛、公牛、绵羊、山羊、马、猴子和其它非人类灵长类。

在此所用, “细菌” 指具有非区室化的环状 DNA 和大约 70S 的核糖体的小原核生物体 (线尺寸大约 1 微米)。细菌蛋白质合成与真核细胞的合成不同。许多抗细菌抗生素干扰细菌蛋白质合成, 但不影响被感染宿主的蛋白质合成。

在此所用, “真细菌” 指除古细菌之外的细菌中的一个主要亚门。大部分革兰氏阳性细菌、蓝细菌、支原体、肠细菌、假单胞菌和叶绿体是真细菌类。真细菌的细胞质膜含有酯联脂类; 在细胞壁 (如果存在) 中存在肽聚糖; 并且未在真细菌内发现内含子 (基因内区)。

在此所用, “古细菌” 是指除真细菌之外的细菌中的一个主要亚门。古细菌有三种主要的目: 极端嗜盐古菌、产甲烷古菌、超嗜热的元素硫代谢古菌。古细菌在核糖体结构、具有内含子 (在某些情况下) 和其它包括膜组成的特征上与真细菌不同。

在此所用, “真菌” 指真核生物体中的一类, 它们的生长形式是不规则团块, 没有根、茎或叶, 并且没有叶绿素或其它能进行光合作用的色素。每一种生物体 (叶状体) 是纤维状单细胞, 拥有被含有葡聚糖或几丁质或两者都含有的细胞壁包围的分支结构 (菌丝体), 并且含有真核。

在此所用, “病毒” 指活的专性胞内寄生物, 但为非细胞结构, 由 DNA 或 RNA 和蛋白质外壳构成。病毒的直径范围是从大约 20 到大约 300 nm。第 I 类病毒 (Baltimore 病毒分类系统) 以双链 DNA 作为它们的基因组; 第 II 类病毒以单链 DNA 作为它们的基因组; 第 III 类病毒以双链 RNA 作为它们的基因组; 第 IV 类病毒以正单链 RNA 作为它们的基因组, 基因组本身起 mRNA 的作用; 第 V 类病毒以负单链 RNA 作为它们的基因组, 其中基因组被用作 mRNA 合成的模板; 第 VI 类病毒以正单链 RNA 作为它们的基因组, 但在复制中和 mRNA 合成中都有一个 DNA 中间物。多数病毒通过它们在植物、动物和原核生物中引起的疾病来识别。原核生物病毒称为噬菌体。

在此所用, “组织” 指相似细胞及它们周围的胞内物质的集合。在体内有四类基本组织: 1) 上皮组织; 2) 结缔组织, 包括血液、骨和软骨; 3) 肌肉组织; 和 4) 神经组织。

在此所用, “器官” 指任何能执行一定功能的身体结构, 如呼吸、分泌或消化功能。

在此所用, “样品” 指任何可能含有用本方法和/或试剂盒扩增的靶核酸的物质。所述样品可以是生物样品, 如生物液体或生物组织。生物液体的实例包括尿、血、血浆、血清、唾液、精液、粪便、痰、脑脊液、眼泪、粘液、羊水或类似物。生物组织是细胞集合体, 通常是一个特殊的种类和它们的细胞间物质, 它们共同形成人、动物、

植物、细菌、真菌或病毒结构包括结缔组织、上皮组织、肌肉组织和神经组织中的结构物质。生物组织的实例包括器官、瘤、淋巴结、动脉和单个细胞。可以对生物组织加工来获得细胞悬浮液样品。该样品也可以是在体内准备的细胞的混合物。该样品也可以是培养的细胞悬浮液。如果是生物样品，那么该样品可以是天然样品或对原始样品经过各种加工或制备后获得的加工样品。例如，可以用各种细胞分离方法（如磁活性细胞分类）从体液样品如血液来分离或富集目标细胞。本发明所用样品包括富集了目标细胞的细胞制品。

在此所用，“液体（流体）样品”指自然存在的液体或流体样品，如生物学流体。

“液体样品”也指自然存在的非液态样品，如固体或气体，但制备为含有固体或气体样品物质的液体、流体、溶液或悬浮液。例如，液体样品可以包括液体、流体、溶液或含生物组织的悬浮液。

在此所用，“磁性物质”指任何固有磁体特性的物质，以及通过产生、引发或制备而具有磁力特性的物质。

在此所用，“可磁化物质”指任何具有与磁场相互作用特性的物质，因此，当被自由地悬浮或放置在磁场中时，具有感应磁化并产生磁矩的特性。可磁化物质的实例包括，但不限于，顺磁物质、铁磁物质和亚铁磁物质。

在此所用，“顺磁物质”指有永久磁偶极矩的单个原子、离子或分子的物质。在不存在外部磁场时，原子偶极指向任意方向，并且在任何方向，物质作为整体没有磁化。当施加外部磁场时，原子偶极趋向于将其自己指向与磁场平行的方向，因为这种情况是比反平行位置的能量低的状态。这产生了与磁场平行的净磁化，并且对磁化系数产生了正作用。可以在多种文献中发现对“顺磁物质”或“顺磁性”的进一步详述，如由 B. I. Bleaney 和 B. Bleaney, Oxford, 1975 所著的“Electricity and Magnetism”中的第六章，第 169-171 页。

在此所用，“铁磁物质”指以具有非常大的磁化系数（正）值为特征的物质，它们依赖于所施加的磁场强度。另外，甚至在不存在所施加的磁场时，铁磁物质也可以有磁矩，并且在零磁场中所保留的磁化被称为“剩磁”。可以在多种文献中发现对“铁磁物质”或“铁磁性”的进一步的详述，如由 B. I. Bleaney 和 B. Bleaney, Oxford, 1975 所著的“Electricity and Magnetism”中的第六章，第 171-174 页。

在此所用，“亚铁磁物质”指表现出与普通铁磁物质类似的自发磁化、剩磁和其它特性的物质，但自发磁矩与该物质中与（磁性）偶极完全平行的分布所期望的值不相符。可以在多种文献指发现对“亚铁磁物质”或“亚铁磁性”的进一步的系数，如由 B. I. Bleaney 和 B. Bleaney, Oxford, 1975 所著的“Electricity and Magnetism”中的第 16 章，第 519-524 页。。

在此所用,“金属氧化物颗粒”指任何颗粒形式的金属氧化物。某些金属氧化物具有顺磁性或超顺磁性特性。“顺磁性颗粒”的定义是,易受所使用的外部磁场的影响,但不能维持永久磁畴的颗粒。换句话说,“顺磁性颗粒”的定义也可以是,用“顺磁性物质”制成的颗粒。顺磁性物质的非限定性实例包括某些金属氧化物颗粒如 Fe_3O_4 颗粒、金属合金颗粒如 CoTaZr 颗粒。

在此所用,“有毒试剂”指对人类健康有害的任何物质,如氯仿或苯酚。

B. 扩增靶细胞或病毒的核酸的方法和试剂盒

一方面,本发明提供一种扩增靶细胞或病毒的核酸的方法,该方法包括: a) 将含有或可能含有靶细胞或病毒的样品与磁性微珠接触; b) 如果在所述样品中存在所述靶细胞或病毒,允许其与所述磁性微珠结合,以在所述靶细胞或病毒与所述磁性微珠形成复合物; 和 c) 通过磁力从其它不合要求的成分中分离所述复合物,以便从所述样品中分离所述靶细胞或病毒; 和 d) 将所述被分离的复合物用于核酸扩增系统,以便对来自所述靶细胞或病毒的核酸进行扩增。

另一方面,本发明关于一个扩增靶细胞或病毒的核酸的试剂盒,该试剂盒在相同或不同容器中包括: a) 一个接触含有或可能含有靶细胞或病毒的样品的磁性微珠; b) 如果在所述样品中存在所述靶细胞或病毒,允许其与所述磁性微珠结合,以便在所述靶细胞或病毒与磁性微珠形成复合物的装置; c) 通过磁力从所述样品中使所述复合物从其它不合要求的成分中分离出来的装置; 和 d) 一个对来自所述靶细胞或病毒的核酸进行扩增的系统。该试剂盒进一步包括用该试剂盒从样品扩增靶细胞或病毒的核酸的说明书。

本方法和试剂盒可以被用来从任何合适的样品扩增任何合适的靶细胞、细胞器或病毒中的任何合适的靶核酸。代表性样品包括临床样品、血清、血浆、全血、痰、脑脊液、羊水、尿、胃肠内容物、头发、唾液、汗、齿龈刮取物、骨髓、组织和细胞培养物。代表性靶细胞包括动物细胞、植物细胞、真菌细胞、细菌细胞、重组细胞和培养细胞。代表性靶病毒包括真核细胞病毒和噬菌体。靶核酸包括 DNA、RNA 或其混合物。

可以用任何合适的方法来制备磁性微珠。例如, CN 01/109870.8 或 W002/075309 中公开的方法。可以用任何合适的可磁化物质来制备在本方法和试剂盒中有用的磁性微珠。可磁化物质的非限定性实例包括亚铁磁物质、铁磁物质、顺磁物质或超顺磁物质。在一个特定实施方案中,磁性微珠包括顺磁物质,如顺磁金属氧化物组合物。优选地,顺磁金属氧化物组合物是过渡金属氧化物或其合金。可以使用任何合适的过渡金属,如铁、镍、铜、钴、锰、钽(Ta)、锌和锆(Zr)。在一个优选的实施方案中,金属氧化物组合物是 Fe_3O_4 或 Fe_2O_3 。在另一个实施例中,在磁性微珠中所用的可磁化物

质包括金属组合物。优选地，金属组合物是过渡金属组合物或其合金，如铁、镍、铜、钴、锰、钽、锆和钴钽锆 (CoTaZr) 合金。

可以用可以得到的初级珠、原材料或用单体包封的金属氧化物来制备磁性微珠，当单体交联时会形成刚性、聚合涂层，其中如美国专利 5,834,121 中公开的。在此所用，“刚性”指聚合涂层被交联到这样的程度，即聚合涂层能稳定涂层内部的金属氧化物颗粒（即涂层基本上不会溶胀或溶解），以便颗粒保持被包封于其中的状态。在此所用，“微孔”指可以在极性有机溶剂中溶胀或膨胀的树脂聚合物基质。在此所用，“载荷”指珠子中用于官能化或衍生化作用附着位点的容量。

例如，可以被作为可磁化物质掺入的合适物质包括，氧化铁如磁铁矿、铁酸锰、铁酸钴和铁酸镍，赤铁矿和各种合金。磁铁矿是优选的金属氧化物。经常地，有人教导将金属盐转化为金属氧化物，然后或者用聚合物涂层或者被吸附到其上具有还原基团的热塑性聚合树脂的珠子中。当用金属氧化物颗粒作为原料来获得疏水初级珠时，有必要提供一种来源于乙烯基单体，优选是能用微孔基质结合或被结合的交联聚苯乙烯的热塑性聚合物刚性涂层。可以用本领域已知的方法来形成磁性颗粒，如下述文献中给出的方法：Vandenberge 等人，J. of Magnetism and Magnetic Materials, 15-18:1117-18 (1980)；Matijevic, Acc. Chem. Res., 14:22-29 (1981)；美国专利 5,091,206；4,774,265；4,554,088 和 4,421,660。可以在本发明中使用的初级珠的实例在下述专利中给出：美国专利 5,395,688；5,318,797；5,283,079；5,232,7892；5,091,206；4,965,007；4,774,265；4,654,267；4,490,436；4,336,173；和 4,421,660。或者，可以从商业上可获得的满足如下起始要求的疏水或亲水珠子来获得初级珠，这些要求为尺寸、聚合涂层在溶剂中的溶胀上具有足够稳定性以保留顺磁性颗粒、吸附或吸收用于形成网捕基质网状物的乙烯单体的能力。优选地，初级珠是疏水、聚苯乙烯包封的顺磁珠子。这样的聚苯乙烯顺磁珠子可以从以下公司获得：Dynal, Inc. (Lake Success, N.Y.)、Rhone Poulenc (France) 和 SINTEF (Trondheim, Norway)。也考虑使用具有被进一步包封来产生外部刚性聚合涂层的不稳定聚合物首次涂敷的有机调色剂颗粒或磁性颗粒。

在本方法和试剂盒中所用的磁性微珠可以有任意的合适尺寸，如直径在大约 5~ 大约 50,000 纳米之间。

在本方法和试剂盒中所用的磁性微珠可以未经处理或被改性，如用有机分子改性。在一个特定实施方案中，磁性微珠被改性以便包括羟基、羧基或环氧基基团。在另一个特定实施方案中，磁性微珠被改性以便包括一个部分，如抗体或其功能片断，它们特定地与靶细胞或病毒结合。另外，如果在所述样品中存在靶细胞或病毒，允许其高特异性地与磁性微珠结合而形成复合物。而且另外地，如果在所述样品中存在靶

细胞或病毒，允许其非特异性或低特异性地与磁性微珠结合而形成复合物。

在靶细胞或病毒与磁性微珠形成的被分离的复合物可以直接被用于扩增其中所含靶核酸。另外，该方法进一步包括，在将被分离的复合物用于核酸扩增系统之前洗涤被分离的复合物以去除不合要求的成分。

- 5 本方法可以手工进行。优选地，本方法使用自动化技术来进行。本方法的任何、一些或所有步骤都可以是自动化的。例如，样品接触、结合、分离，以及任何其它额外的步骤如洗涤、靶细胞或病毒释放和生物物质回收或扩增步骤都可以是自动化的。

本方法可以在任何合适的时间范围内进行。例如，本方法可以在大约 0.5 分钟～大约 30 分钟的范围进行。

- 10 本方法可以在任何合适的温度下进行。例如，本方法可以在不需要对温度进行控制的情况下，在大约 0℃～大约 35℃的周围环境温度下进行。

本方法可以以任何合适的体积进行。例如，本方法可以以大约 5 μ l～大约 50 μ l 的体积进行。

- 15 本方法可以用微量离心管进行。本方法可以在不进行沉淀和离心过程的情况下进行。本方法可以在不使用有毒试剂的情况下进行。

在一个特定实施方案中，靶细胞是从全血、骨髓或淋巴如新鲜或低温保存的全血、骨髓或淋巴分离的白细胞。在另一个特定实施方案中，如中国专利申请 02153992.8 所述，靶细胞是从唾液、尿和组织培养物中分离的上皮脱落细胞或细菌细胞。

- 20 可以在本方法和试剂盒中使用任何合适的核酸扩增系统。代表性核酸扩增系统包括聚合酶连式反应 (PCR) (美国专利 4,683,195 和 4,683,202 以及 Ausubel (Ed.) Current Protocols in Molecular Biology, 15. The Polymerase Chain Reaction, John Wiley & Sons, Inc. (2000))、连接酶连式反应 (LCR)、核酸序列基扩增 (NASBA) (美国专利 5,409,818 and 5,554,517)、链置换扩增 (SDA) 和转录调节扩增 (TMA) 系统。

- 25 本方法进一步包括，在将样品与磁性微珠接触之前，从含有或可能含有靶病毒或噬菌体的样品中去除细胞。

- 30 仍然在另一方面，本发明提供一种扩增靶细胞或病毒的核酸的方法，该方法包括：
a) 将含有或可能含有靶细胞或病毒的样品与磁性微珠接触；b) 如果在所述样品中存在所述靶细胞或病毒，允许其与所述磁性微珠结合，以在所述靶细胞或病毒与所述磁性微珠形成复合物；和 c) 通过磁力从其它不合要求的成分中分离所述复合物，以便从所述样品中分离所述靶细胞或病毒；d) 从所述细胞-微珠或病毒-微珠复合物释放核酸，以形成核酸-微珠复合物；和 e) 将所述被分离的复合物用于核酸扩增系统，以便对来自所述靶细胞或病毒的核酸进行扩增。

本方法进一步包括，在将核酸-微珠复合物用于核酸扩增系统之前，洗涤核酸-微珠复合物以去除不合要求的成分。该方法进一步可以包括，在将核酸-微珠复合物用于核酸扩增系统之前，通过磁力从其它不合要求的成分中分离核酸-微珠复合物。

5 仍然在另一方面，本发明关于一个扩增靶细胞或病毒的核酸的试剂盒，该试剂盒在相同或不同容器中包括：a) 一个接触含有或可能含有靶细胞或病毒的样品的磁性微珠；b) 如果在所述样品中存在所述靶细胞或病毒，允许其与所述磁性微珠结合，以便在所述靶细胞或病毒与磁性微珠形成复合物的装置；c) 通过磁力从所述样品中使所述复合物从其它不合要求的成分中分离出来的装置；d) 从所述细胞-微珠或病毒-微珠复合物释放核酸，以形成核酸-微珠复合物的装置；和 e) 一个对来自所述靶细胞或病毒的核酸进行扩增的系统。

10 该试剂盒进一步包括用该试剂盒来扩增来自样品的靶细胞或病毒的核酸的说明书。

C. 代表性实施方案

15 此处描述的实施方案总的来说涉及 PCR 模板的制备和使用磁性微珠扩增核酸如基因的方法。通过非特异性或低特异性吸附到细胞或核酸，可以从全血、血浆、血清、骨髓、唾液、尿和细胞和组织培养液中分离含有靶生物分子（如核酸和蛋白质）的细胞和生物物质（如白细胞、病毒、上皮细胞和培养细胞），它们一起与磁性微珠形成微珠细胞复合物。在洗脱细胞裂解之后，释放出的核酸被磁性微珠吸附，它们形成了微珠核酸复合物。将微珠细胞和微珠核酸复合物加入 PCR 系统，作为 PCR 反应的模板。

20 由于去除了杂质和 PCR 抑制剂以及磁性微珠微不足道的影响，基因扩增的灵敏度和稳定性没有受到影响。

实施方案的一个重要的方面是用磁性微珠来分离靶细胞，所获得的细胞可以被用作靶基因的 PCR 模板。大部分抑制因素可以被除去。磁性微珠可以吸附细胞或病毒以及核酸。所述简单且快速的方法可以在诊断分析和研究中使用，并且可以容易地建立

25 一种自动且微调的设备。

这些实施方案具有下述主要优点：

(1) 在该方法中所用的样品和试剂的量很小。该方法可以处理 5 μ l 全血或唾液，并且所用试剂的体积小于 50 μ l。

(2) 制备过程可以在室温下操作，不需要离心和温度控制。

30 (3) 操作简单、快速且方便。整个过程仅用大约 0.5~15 分钟。

(4) 可以避免或降低该方法中的转移操作和污染样品的可能性。

(5) 分离方法是通用的，且适合于许多种类的样品。

(6) 在该方法中对操作者和环境没有危害。

(7) 可以容易地使该方法自动化和小型化, 从而获得模板制备和扩增过程同时进行的方法。

1. 非特异性的细胞吸附和分离以及 PCR 模板的制备

5 在生命科学中, 从样品中分离细胞是一个关键和基本步骤。密度梯度离心分离法通常基于细胞的尺寸和密度差异使用。然而, 离心法所需要具备的条件使得它很难建立微型设备。载体设备建立在芯片上, 以基于细胞的尺寸差异过滤靶细胞。由于该设备难以加工, 所以不是通用的。从原理上来说, 用磁性微珠分离细胞的方法有两类。一类是使用来自特异性抗体的磁性微珠的特异性分离。另一类是使用选择性离心或磁性微珠的细胞吸附差异来分离细胞。第一类方法适合于许多种细胞, 并且分离的细胞
10 具有高特异性。但这种磁性微珠不仅昂贵, 而且需要严格的运输和保存条件且容易失去其生物活性。第二类方法的通用性较低。但磁性微珠不仅便宜, 而且不需要严格的运输和保存条件。环境条件对分离操作的影响很小, 且该方法简单。

在该实施方案中, 未使用或使用了有机材料涂层的磁性微珠可以在适当的化学和物理条件下有效地富集靶细胞且吸附核酸。所获得的微珠细胞和微珠核酸复合物可以
15 被用作基因扩增的 PCR 模板。因此, 模板制备和基因扩增被整合, 且适合于 PCR 设备的建立。该方法简单且快速。从全血、血浆、血清、骨髓、唾液、尿和细胞和组织培养液来制备模板仅需要 1 分钟。

1.1 固态载体的制备

可以在 CN 01/109870.8 or W002/075309 中找到涂层磁性微珠的制备方法。

20 1.2 操作程序

(1) 将少量磁性微珠 (悬浮在 Tris-EDTA 缓冲液中, Ph 6.0) 加入液态生物样品中。用涡旋混合器轻轻地搅拌该混合物, 并且在室温下将其温育 3 分钟, 以形成微珠细胞复合物。

(2) 用磁场分离磁性微珠细胞复合物, 弃去上清液。用 70% 乙醇溶液将磁性微
25 珠细胞复合物洗涤一次。可以将洗涤后的微珠细胞复合物直接加入到 PCR 系统中用于基因扩增。

(3) 将少量细胞裂解溶液加入该混合物, 用涡旋混合器均匀地混合悬浮液, 并且在室温下温育 1 分钟以裂解细胞。可以将异丙醇加入该混合物, 用涡旋混合器均匀地混合悬浮液, 然后使其静止保持 5 分钟以形成复合物。

30 (4) 用磁场分离磁性微珠核酸复合物, 弃去上清液。用 70% 乙醇溶液将磁性微珠核酸复合物洗涤二次以除去盐。洗涤后的微珠核酸复合物被直接加入到 PCR 系统中用于基因扩增。

1.3 化学试剂的含量

(1) TE 缓冲液 (pH 6.0): 10 mM EDTA / 25mM Tris-HCl。

(2) 裂解溶液: NaI 11.25 g; 尿素 12.0 g; Triton X-100 0.65 ml; TE (pH 8.0) 30 ml; 10 mM EDTA / 25mM Tris-HCl。

1.4 主要优点

该方法有下述主要优点: (1) 操作简单且快速, 仅需要大约 1~10 分钟; (2) 仅需要一个微量离心管, 不需要沉淀; (3) 所获得的产物适合随后的生物操作; (4) 容易实现自动化操作; (5) 操作安全且不使用有毒试剂; (6) 在室温下操作; (7) 磁性微珠容易保存, 它们对分离效果的影响可以忽略不计。

2. 细胞的特异性吸附和分离以及 PCR 模板制备

2.1 操作程序

(1) 将与特定细胞表面的抗原反应的来源于抗体的少量磁性微珠加入液态生物样品。用涡旋混合器轻轻地搅拌该混合物, 并且在室温下将其温育 15 分钟, 以形成微珠细胞复合物。

(2) 用磁场分离磁性微珠细胞复合物, 弃去上清液。用 70%乙醇溶液将磁性微珠细胞复合物洗涤一次。洗涤后的微珠细胞复合物被直接加入到 PCR 系统中用于基因扩增。

(3) 将少量细胞裂解溶液加入该混合物, 用涡旋混合器均匀地混合悬浮液, 并且在室温下培养 1 分钟以裂解细胞。可以将异丙醇加入该混合物, 用涡旋混合器均匀地混合悬浮液, 然后使其静止保持 5 分钟以形成复合物。

(4) 用磁场分离磁性微珠核酸复合物, 弃去上清液。用 70%乙醇溶液将磁性微珠核酸复合物洗涤一次以除去盐。洗涤后的微珠核酸复合物被直接加入到 PCR 系统中用于基因扩增。

2.2 化学试剂的含量

(1) TE 缓冲液 (pH 6.0): 10 mM EDTA / 25mM Tris-HCl。

(2) 裂解溶液: NaI 11.25 g; 尿素 12.0 g; Triton X-100 0.65 ml。

2.3 主要优点

该方法有下述主要优点: (1) 操作简单且快速, 仅需要大约 20~30 分钟; (2) 仅需要一个微量离心管, 不需要沉淀; (3) 所获得的产品适合随后的生物操作; (4) 容易实现自动化操作; (5) 操作安全且不使用有毒试剂; (6) 容易去除 PCR 抑制剂。

D. 实施例

实施例 1. 人类全血的 HLA-A 基因模板制备和扩增

用血液 1/6 体积的 ACD 来防止来自健康捐赠人的人类全血凝固。分离白细胞的步骤如下。将 50 μ L 未凝固的血加入 1.5mL 微量离心管中, 其中含有 10 μ L 的悬浮在

5 Tris-EDTA 缓冲液(pH 6.0)中的 $15\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 磁性微珠。用涡旋混合器轻轻地搅动该混合物 15 秒, 并且在室温下温育 3 分钟。然后将微珠白细胞复合物固定在外磁场上, 并且弃去上清液。用 $100\mu\text{L}$ 70%乙醇溶液将磁性微珠白细胞复合物洗涤二次。上述洗涤后的微珠白细胞复合物可以被直接加入到 PCR 系统中用于 HLA-A 基因扩增。用琼脂糖凝胶电泳分析该产物。

10 上述微珠白细胞复合物可以直接被用来提取核酸。将 $50\mu\text{L}$ 细胞裂解溶液(NaI 11.25 g; 尿素 12.0 g; Triton X-100 0.65 ml; TE (pH 8.0) 30 ml: 10 mM EDTA / 25mM Tris-HCl)加入该混合物, 用涡旋混合器均匀地混合该悬浮液, 并且在室温下培养 1 分钟以裂解白细胞。将 $300\mu\text{L}$ 异丙醇加入该混合物, 用涡旋混合器均匀地混合该悬浮液, 然后静止保持 5 分钟。用磁力架分离微珠核酸复合物, 并且弃去上清液。用 $100\mu\text{L}$ 70%乙醇溶液将磁性微珠核酸复合物洗涤二次。在室温下彻底蒸发掉乙醇后, 将 $50\mu\text{L}$ Tris-HCl (pH 6.0) 加入该复合物, 并且在室温下温育 10 分钟以洗提 DNA。磁性微珠核酸复合物可以被直接加入到 PCR 系统中用于 HLA-A 基因扩增。洗提后的 DNA 被用作基因扩增的模板。

15 上述三种模板在基因扩增的效果和灵敏度上的差别很小, 这在图 1 给出。

实施例 2. 来自唾液的 HLA-A 基因模板制备和扩增

20 所使用的唾液是由健康的捐赠者提供的。分离白细胞的步骤如下。将 $50\mu\text{L}$ 唾液加入 1.5mL 微量离心管中, 其中含有 $10\mu\text{L}$ 悬浮在 Tris-EDTA 缓冲液(pH 6.0)中的 $15\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 磁性微珠的。用涡旋混合器轻轻地搅动该混合物 15 秒, 并且在室温下温育 3 分钟。然后将微珠上皮细胞复合物固定在外磁场上, 并且弃去上清液。用 $100\mu\text{L}$ 70%乙醇溶液将磁性微珠上皮细胞复合物洗涤二次。上述洗涤后的微珠上皮细胞复合物可以被直接加入到 PCR 系统中用于 HLA-A 基因扩增。用琼脂糖凝胶电泳分析该产物。

实施例 3. 人类全血的 HLA-A 基因模板制备和扩增

25 用血液 1/6 体积的 ACD 来防止来自健康捐赠人的人类全血凝固。分离白细胞的步骤如下。将用 $100\mu\text{L}$ 细胞裂解溶液 (0.5% Na_2EDTA , 0.1M Tris, 0.1M NaCl, 1% NP-40, $30\mu\text{L}$ 蛋白酶 K ($20\text{mg}/\text{mL}$, pH 7.8))混合的 $50\mu\text{L}$ 未凝固的血加入 1.5mL 微量离心管中, 其中含有 $10\mu\text{L}$ 的悬浮在 Tris-EDTA 缓冲液(pH 6.0)中的 $15\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 磁性微珠的。用涡旋混合器均匀地混合悬浮液, 并且在室温下温育 15 分钟。然后将磁性微珠-DNA-抗-DNA 复合物固定在外磁场上, 并且弃去上清液。将 $50\mu\text{L}$ Tris-HCl (pH 6.0) 加入复合物, 并且在室温下温育 10 分钟以洗提 DNA。将洗提后的 DNA 加入到 PCR 系统中用于扩增 HLA-A 基因。用琼脂糖凝胶电泳和紫外吸收光谱分析该产物。该方法, 没有使用有毒试剂, 具有良好的可重复性和很高的分离效果。

实施例 4. 人类全血的 HBV 病毒基因模板制备和扩增

用血液 1/6 体积的 ACD 来防止来自携带 HBV 病毒的捐赠者的人类全血的凝固。分离病毒的步骤如下。从 500 μ L 全血中分离出 200 μ L 血清。将其加入含有 50 μ L 的来自抗 HBV 病毒抗体的 15 μ g/ μ L 磁性微珠的 Tris-EDTA 缓冲液 (pH 6.0) 中。用温和的涡旋混合器均匀地混合悬浮液，并且在室温下温育 15 分钟。然后将磁性微珠-病毒-
5 抗 HBV 病毒抗体复合物固定在外磁场上，并且弃去上清液。将复合物加入到 PCR 系统中用于扩增 HBV 基因。直接用琼脂糖凝胶电泳和紫外吸收光谱分析该产物。该方法，没有使用有毒试剂，具有良好的可重复性和很高的分离效果。

上述实施例仅用于说明目的，并不意在限定本发明的范围。对上述描述做很多变化是可能的。因为对上边所述实施例的修正和变化对本领域技术人员是显而易见的，
10 所以本发明仅受所附权利要求范围的限制。

说明书附图

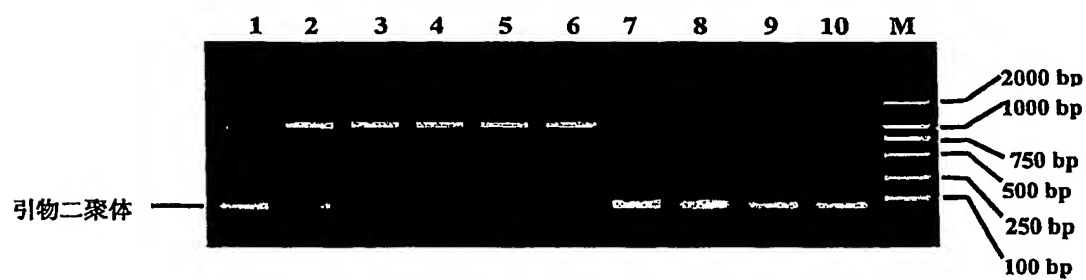


图 1